

黄荆籽抗氧化成分研究

郑公铭¹, 罗宗铭¹, 陈达美²

(1. 广东工业大学化学工程系, 广东 广州 510090; 2. 中山学院, 广东 中山 528400)

摘要:对黄荆籽提取物进行柱层析、薄层层析分离得 9 个成分, 其中 6 个抗氧化效果明显, 初步鉴定为黄酮类化合物, 其中三种为查耳酮类化合物.

关键词:黄荆籽; 分离; 抗氧化; 黄酮

中图分类号: O625. 42; O656. 22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007 - 7162(1999)02 - 0041 - 07

现在的食品抗氧化剂主要是以 BHA、BNT、TBHQ 为代表的合成品, 而天然品 VC、异 VC、VE 使用量不大, 在我国 VE 仅仅用于医药, 原因是成本高, 效果也不如合成品. 由于合成品的安全性尚未作出定论, 由于人们健康意识的日益加强, 所以现在整个食品添加剂工业的发展趋势是“安全、天然、营养、多功能”^[1]. 对于天然食品抗氧化剂, 人们已经做了大量的研究, 但大多难以产业化, 原因是有的效果不理想, 有的效果虽好, 但成本高, 所以寻求多功能、高效价廉的天然食品抗氧化剂仍是食品抗氧化剂研究开发的目标.

黄荆分布于我国南方十几个省, 野生资源丰富. 中南各省农村将其茎、叶、籽浸于农田为杀虫保苗起一定的作用, 叶和籽亦可用作治疗流感和肠胃炎等等的药物. 它们的成分、药理应用研究已比较深入^[2], 但应用于食品抗氧化剂的研究则未见报道, 若能进一步开发应用, 使其既具有药理保健功能又有食品抗氧化作用, 前景则十分广阔. 本文研究了黄荆籽的抗氧化成分, 从黄荆籽提取物中分离得到 6 个具有明显抗氧化活性的黄酮类化合物, 其中 3 个为查耳酮.

1 实验部分

1.1 材料、试剂、药品和仪器设备

1.1.1 材料

黄荆籽, 四川产(11 - 12 月采收); 猪油, 市售正常肥猪肉煎制.

1.1.2 仪器设备

玻璃色谱柱($\phi 50\text{mm} \times 600\text{mm}$); 真空泵、旋转蒸发仪(天津玻璃仪器厂); ZF - 1 三用紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂).

1.1.3 层析固定相

硅胶 G(10 - 40 μm , TLC 用), 青岛海洋化工厂; 聚酰胺(30 - 60 目), 进口分装, 用前粉碎, 过 100 目筛; 羧甲基纤维素钠(CMC), 粘合剂.

1.1.4 展开剂

冰醋酸: 水 = 3 : 2; 甲醇: 氯仿 = 1 : 4.

收稿日期: 1998 - 06 - 25

作者简介: 郑公铭(1967 -), 男, 硕士研究生; 主要研究方向: 食品添加剂及生物有机制剂.

1.1.5 药品

β -胡萝卜素, 1g 装, 进口分装.

1.1.6 显色剂

浓氨水; 2 % 三氯化铁—乙醇溶液; 2 % 醋酸镁—乙醇溶液; 氢氧化钠溶液 (1mol/L); 2 % 三氯化铝—乙醇溶液; 硫酸溶液 (98 % 硫酸 : 水 = 1 : 1); 2 % 氯氧化铝—甲醇溶液.

甲醇钠: 2.5g 新鲜切开的金属钠小心地加到 100mL 无水甲醇中, 反应完后, 立即用塑料塞密封.

三氯化铝—甲醇溶液: 5g 新鲜的无水三氯化铝小心地加到 100mL 无水甲醇中.

盐酸: 50mL 化学纯盐酸与 100mL 蒸馏水混合.

本课题在于从黄荆籽提取物中寻求抗氧化作用较强的组分, 因此整个过程中, 分离与测定抗氧化性交替进行, 总的实验过程如图 1 所示.

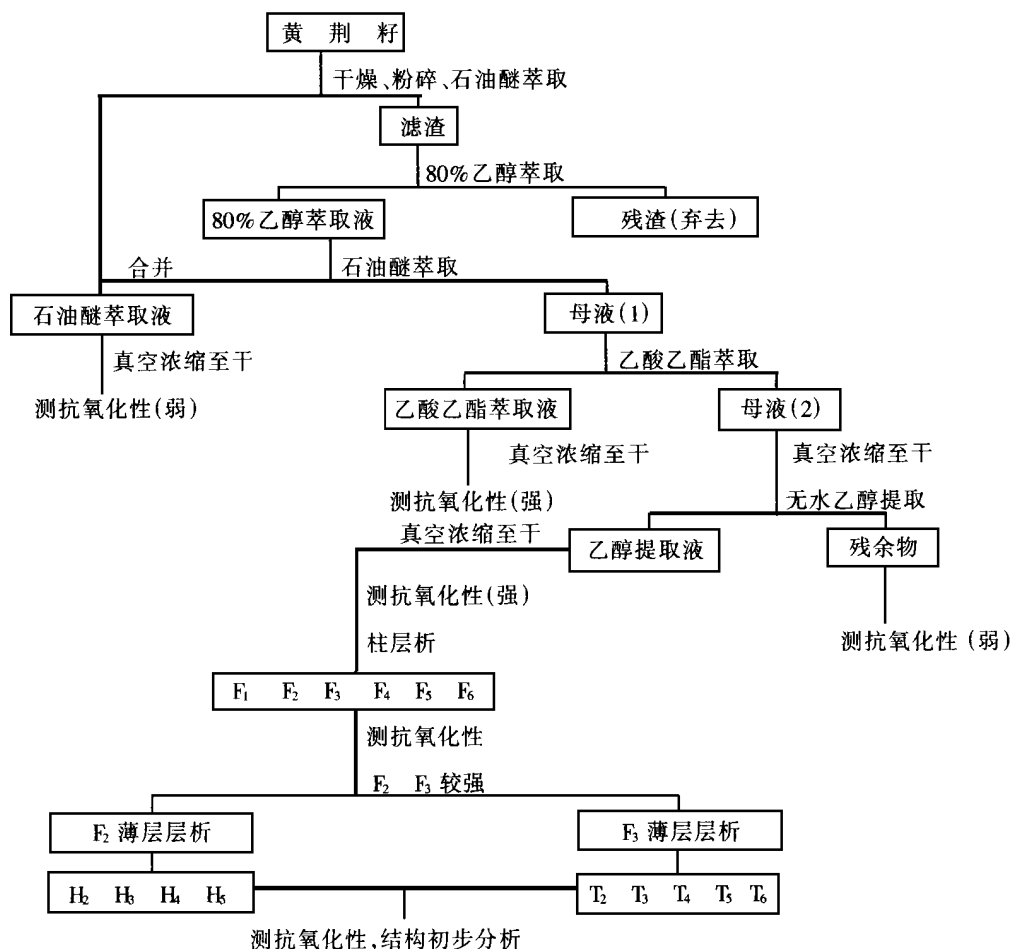


图 1 实验过程示意图

1.2 有效成分的提取

采用“渗漉法”在室温条件下萃取. 取黄荆籽 1.5kg, 干燥粉碎, 过 20 目筛, 先用 4L 石油醚萃取, 提取大部分脂溶性成分, 再用 15L 80 % 乙醇萃取.

将 80 % 乙醇萃取液经真空旋转蒸发浓缩得褐色糖浆状粗提物约 200mL, 再经以下处理:

(1) 石油醚萃取:再依次用 300、200、200mL 石油醚萃取上述粗提物,进一步提取脂溶性组分,合并上述提取液,真空旋转蒸发脱去溶剂,得墨绿色物,总重为 40.5g(2.70%)。

(2) 乙酸乙酯萃取:依次用 500、400、300、300、250、200、200mL 乙酸乙酯对上述石油醚萃取过的母液 1 萃取,萃取液真空旋转蒸发浓缩至干,得墨绿色物质,约 28g(1.87%)。

(3) 无水乙醇提取:先把上述乙酸乙酯萃取过的母液 2 浓缩至干,再依次用 300、300、250、250、200、200mL 无水乙醇提取,提取液真空旋转蒸发至干,得棕褐色物质约 37g(2.47%)。

(4) 剩下的残余物自然挥干,得褐色物质约 46.5g(3.10%)。

1.3 四个组分的抗氧化性测定

取 5 份猪油,1 份为空白对照,另外 4 份分别添加 0.1% 的 1.2 中分离出的 4 个组分即石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、无水乙醇提取物、残余物,搅匀,置于电热恒温水浴锅内,控制在 $(70 \pm 5)^\circ\text{C}$,每隔一定时间测定油脂的过氧化值(POV)。测定方法参照文献[3]。

以下选择抗氧化活性最强的组分作进一步研究。

1.4 无水乙醇组分分离及抗氧化试验

1.4.1 柱层析预分离

取 100~160 目的聚酰胺 140g,以蒸馏水浸渍一天,湿法装入 $\phi 50\text{mm} \times 600\text{mm}$ 的玻璃色谱柱中,以蒸馏水平衡后,将 10g 无水乙醇组分加少量蒸馏水溶解,小心加到上述柱中,先以水洗脱,然后依次用 30%、50%、75%、95% 乙醇溶液洗脱,每种洗脱液用量为 200mL,洗脱速度为 16~20 滴/min,洗脱过程中依次看到红棕色、黄色、橙色、棕黄色色段。

每 40mL 收集一份,浓缩,然后用纸层析(滤纸大小为 $12\text{cm} \times 12\text{cm}$,展开剂为冰醋酸:水 = 3:2),紫外光(365nm)检测,根据色点的颜色、荧光、比移值相似者合并,将洗脱流出物分为 $F_1 - F_6$ 6 个组分, F_1 、 F_4 为红棕色, F_2 、 F_3 为橙色, F_5 、 F_6 为棕褐色。

1.4.2 $F_1 - F_6$ 抗氧化活性的初步判断

采用 β -胡萝卜素共氧化法^[4]判定各组分的抗氧化性。方法是:取二张滤纸($15\text{cm} \times 15\text{cm}$),将 $F_1 - F_6$ 分别点样,置层析箱中同时展开(展开剂冰醋酸:水 = 3:2),展开后,其中一张喷以 β -胡萝卜素-亚油酸溶液(5mg β -胡萝卜素 + 2mL 亚油酸配成 50mL 氯仿溶液),暴于日光下,待底色褪去,观察黄色斑点,同时对比没喷的一张,颜色加深程度越大,则抗氧化性越强。

以下选择抗氧化性较强的 F_2 和 F_3 流分作薄层层析(TLC)分离。

1.4.3 TLC 分离 F_2

硅胶板制备:9g 硅胶 G 与 30mL 0.1%羧甲基纤维素钠-水混合,充分搅匀,涂渍于 $20\text{cm} \times 20\text{cm}$ 的薄玻璃板上,自然风干。

点样:用毛细管在硅胶板上划线点样,每块用量为 0.3~0.4mL。

展开:以氯仿:甲醇 = 14:1 展开。

结果:得到 5 条主要色带,比移值如下: $R_{f1} = 0$, $R_{f2} \approx 0.21$, $R_{f3} \approx 0.32$, $R_{f4} \approx 0.43$, $R_{f5} = 0.73$ 。带 I 为较强极性混合物。

制备:如上操作用 5 块板制备。

洗脱:将上述第 2~5 条谱带分别刮下,置于烧杯中,用甲醇充分洗出,过滤,滤液真空旋转蒸发至干,再加入甲醇溶解,得到四种溶液,依 R_f 值从小到大颜色分别为橙黄色、橙黄色、黄色、桔黄色,标号为 H_2 、 H_3 、 H_4 、 H_5 。

1.4.4 TLC 分离 F_3

操作条件同 1.4.3.

结果:得到 6 条较清楚的色谱带,比移值为 $Rf_1 = 0$, $Rf_2 \approx 0.139$, $Rf_3 \approx 0.156$, $Rf_4 \approx 0.167$, $Rf_5 \approx 0.333$, $Rf_6 \approx 0.361$,其中带 I 为较强极性的混合物.

制备:如上操作用 8 块板制备.

洗脱:将上述第 2~6 条色带分别刮下,置于烧杯中以甲醇洗出,过滤,滤液旋转蒸发至干,再加甲醇溶解,放置,得到四种溶液,颜色分别是棕黄色、橙黄色、棕黄色、黄色,依次标号为 T_2 、 T_3 、 T_4 、 T_5 ,一种深黄色针状晶体,标号为 T_6 ,其中 T_2 、 T_5 、 T_6 的量相对较多.

2 结果与讨论

2.1 4 个粗提组分的抗氧化试验结果

由 1.3 测得 4 个组分的 POV 值列于表 1.从表 1 看出,乙酸乙酯组分和无水乙醇组分的抗氧化活性较强,且后者优于前者,而石油醚组分和残余物的抗氧化性较弱,这说明黄荆籽抗氧化有效成分难溶于石油醚,易溶于乙酸乙酯和乙醇.

表 1 4 组分抗氧化实验的 POV 值 (meq/ kg)

样品	加热时间/ h							
	0	24	48	72	96	120	144	168
空白	3.46	6.87	40.21	103.54	214.38	280.39	341.28	
石油醚组分	3.46	7.02	21.36	75.28	130.17	251.21	313.93	
乙酸乙酯组分	3.46	4.89	8.12	10.86	15.63	24.15	38.91	55.87
无水乙醇组方	3.46	4.32	5.83	8.03	11.12	19.58	30.39	44.58
残余物	3.46	7.31	26.05	84.47	152.30	262.34	308.50	

2.2 柱层析分离物的抗氧化活性比较

由 1.4.1 分离所得 $F_1 - F_6$ 组分的抗氧化性经 β -胡萝卜素共氧化法测定,结果表明 F_2 、 F_3 抗氧化性较好, F_1 、 F_4 、 F_5 、 F_6 的抗氧化性较弱,说明柱分离前后两段分离物抗氧化能力较弱,只有中前段分离物抗氧化能力最好,所以只对 F_2 和 F_3 进行 TLC 分离.

2.3 TLC 分离成分的抗氧化比性

由 TLC 分离 F_2 和 F_3 得到 9 个组分,现考查其对猪油的抗氧化能力.取 11 份猪油,1 份为空白油样,1 份添加 0.02 %BHT 为对照样,其余 9 份分别添加 TLC 分离的 9 个组分的溶液 0.5mL,搅匀后,一并置于电热恒温水浴锅内,温度控制在 $(70 \pm 5)^\circ\text{C}$,每隔一定时间测定油脂 POV 值,结果列于表 2.从表 2 可知,这 9 个组分在不同时间范围内有不同程度的抗氧化活性,其中 T_5 、 H_4 的抗氧化效果最好,尤其是 T_5 ,几乎与 BHT 抗氧化能力相当,而 T_2 很弱,其次是 H_3 、 T_3 .

T_6 在 96h 内表现出理想的抗氧化效果,之后油脂过氧化值却迅速增大,原因可能是抗氧化活性物质提供活性氢后形成的自由基不是很稳定的共振体,在活性物质消耗转化后,反过来引发油脂的氧化.

2.4 抗氧化成分的初步鉴定与分析

由于 T_2 、 H_3 、 T_3 的抗氧化效果较差,因此只对 H_2 、 H_4 、 H_5 、 T_4 、 T_5 、 T_6 进行鉴定分析.

表 2 TLC 分离成分抗氧化实验的过氧化值(POV, meq/ kg)

样品	加热时间/ h						
	0	24	48	72	96	120	144
空白	2. 32	3. 94	15. 06	54. 87	276. 60	382. 86	420. 64
BHT	2. 32	2. 55	3. 01	3. 36	3. 59	4. 00	4. 64
H ₂	2. 32	3. 88	6. 37	29. 09	94. 79	167. 56	213. 91
H ₃	2. 32	4. 06	8. 11	49. 13	216. 23	352. 27	429. 91
H ₄	2. 32	3. 36	5. 10	7. 30	12. 17	26. 07	41. 25
H ₅	2. 32	4. 00	7. 22	16. 63	65. 24	123. 53	187. 72
T ₂	2. 32	4. 58	7. 65	53. 07	251. 23	388. 20	463. 52
T ₃	2. 32	3. 13	4. 92	19. 70	121. 67	298. 04	414. 27
T ₄	2. 32	3. 59	8. 88	47. 00	118. 89	199. 31	238. 71
T ₅	2. 32	2. 43	2. 69	3. 30	3. 63	4. 06	5. 97
T ₆	2. 32	3. 05	4. 38	6. 55	14. 82	85. 29	336. 05

2. 4. 1 化学试剂显色反应^[5, 6]

各试样溶液加三氯化铁溶液后均呈黑色,遇三氯化铝溶液日光下无颜色反应,紫外光下均无荧光,加氯化氧化锆溶液时也均无颜色反应,其余显色反应见表 3.

表 3 化学试剂纸上显色反应

样品	日光	UV (365nm)	NH ₃ (日光)	NH ₃ (UV365nm)	H ₂ SO ₄	NaOH	Mg(OAC) ₂ (365nm)
H ₂	淡橙黄	黄绿荧光	黄色	绿色荧光	褐色	黄色	绿色荧光
H ₄	淡黄色	黄绿荧光	深黄	绿色荧光	橙色	深黄	绿色荧光
H ₅	淡桔黄	暗紫色	桔黄	紫色荧光	线黄色	橙色	紫色荧光
T ₄	灰黄色	黄绿荧光	黄色	绿黄荧光	橙色	黄色	绿黄荧光
T ₅	淡黄色	暗绿色	深黄	绿色荧光	黄色	深黄	绿色荧光
T ₆	淡黄色	黄绿荧光	深黄	绿色荧光	橙色	深黄	绿色荧光

从表 3 可以看出这六种组分的显色反应都具有黄酮类化合物的特征显色反应,且都可以与三氯化铁溶液反应,说明它们均是具有酚羟基的黄酮类化合物,不过它们都不与三氯化铝、氯化氧化锆作用,说明它们均没有 C₃ - OH, C₅ - OH 和邻位羟基.

根据表 2 H₄、T₅、T₆ 抗氧化效果好,故对其进一步进行紫外光谱分析.

2. 4. 2 紫外光谱分析

参照文献^[7, 8]分别测定 H₄、T₅、T₆ 在 A. 甲醇, B. 甲醇—甲醇钠, C. 三氯化铝—甲醇, D. 三氯化铝—盐酸—甲醇, E. 醋酸钠—甲醇和 F. 醋酸钠—硼酸—甲醇中的紫外光谱图,结果如表 4.

比较 A、B 可知 H₄、T₅、T₆ 在加入甲醇钠之后带 I 分别红移了 78. 4、71. 4、67. 3nm,根据文献^[7, 8]可推断三者均是具有图 2 结构骨架的查耳酮,比较它们的其他光谱数据可确定它们均无 C₄ - OH、C₂ - OH、C₆ - OH、邻位羟基,因此, H₄、T₅、T₆ 是结构很相似的查耳酮.

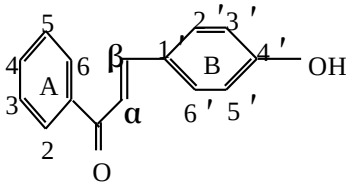


图 2 查耳酮结构

表 4 H_4 、 T_5 、 T_6 的 UV 光谱数据($\lambda_{\max}$, nm)

介质	H_4		T_5		T_6	
	带 I	带 II	带 I	带 II	带 I	带 II
A	354.4	281.2	341.0	288.7	360.9	256.4
B	432.8	282.4	412.4	250.0	428.2	279.6
C	432.4 (主峰)	357.6	280.6	410.0 (主峰)	340.0	286.1
D	428.0 (主峰)	359.8	255.5			
D	352.9	280.6	338.9	286.8	360.0	255.5
E	354.9	281.1	340.0	280.2	360.4	255.8
F	354.3	280.1	340.6	282.4	359.8	256.0

2.5 T_5 、 T_6 、 H_4 抗氧化性差异分析

从表 2 可看出虽然 H_4 、 T_5 、 T_6 都表现了较好的抗氧化性,但三者过氧化值的变化规律并不一致。 T_5 表现了持续的强抗氧化性, H_4 有持续的抗氧化性但在逐渐减弱,而 T_6 开始表现了强抗氧化性,之后过氧化值却迅速增大。根据自由基理论^[9]说明 T_5 很容易提供活性氢,且形成的自由基很稳定, H_4 提供活性氢的难度稍大,形成自由基的稳定性较 T_5 略低,故抗氧化性能 $T_5 > H_4$ 。 T_6 与 T_5 和 H_4 比较虽然易提供活性氢,但形成的自由基不够稳定,致使其活性物质消耗后过氧化值迅速增大,原因可能是 T_5 和 H_4 分子中 B 环上还可能联结有不同延长共轭体系或易使电子云分布离域的基团,或在 C_3' 、 C_5' 、 C_6' 等位置上联结有糖苷,由于糖链对自由基的围绕,使自由基更加稳定,而 T_6 缺乏上述基因,这已从我们测得的¹³C 谱图得到证实,所以 T_6 的 POV 值后期迅速变大,因而它们表现出不同的抗氧化效果。

参考文献:

- [1] 鸣谷. 食品添加剂发展重点[J]. 中国化工, 1995, (12): 58.
- [2] 刘树根. 牡荆属植物的化学成分及其药理作用与临床应用[J]. 江西医药, 1984, (6): 40.
- [3] 王叔淳. 食品卫生检验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1988. 179.
- [4] 林生深, 张晋, 张红等. 从油茶果壳中提取天然抗氧化剂的研究[J]. 广东工业大学学报, 1997, 14(2): 44.
- [5] 姚新生. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 198.
- [6] 林启寿. 纸上色谱及其在中草药成分分析中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1983. 225.
- [7] 北京医学院, 北京中医学院主编. 中草药成分化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1980. 301.
- [8] 黄量. 紫外光谱在有机化学中的应用(下册)[M]. 北京: 科学出版社, 1988. 283.
- [9] 金时俊. 食品添加剂[M]. 上海: 华东化工学院出版社, 1992. 183.

Studies on the Antioxygenic Composition of *Vitex negundo* L.

Zheng Gongming¹, Luo Zongming¹, Chen Damei²

(1. Dept. of chemical Engineering, GDUT, Guanzhou 510090, China ;

2. Zhongshan Institute, Zhongshan 528400, China)

Abstract : The extract of seeds of *Vitex negundo* L. was separated chromatographically and purified to obtain nine components. Six Components of them had been showm as strong antioxidative activity ,and identified preliminarily as flavonoids. Three Components of them were determined to be chalcones.

Key words : *Vitex negundo* L. seed ; separation ; antioxidation , flavonoid

(责任编辑:杨耀辉)